

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta



Autoreferát dizertační práce

**Zvýšení afinity receptoru 1 pro interferon gama k interferonu gama
kombinací molekulárního modelování a experimentálních metod**

**Increasing affinity of Interferon gamma receptor 1
to Interferon gamma by combining molecular modeling
and experimental methods**

Mgr. Pavel Mikulecký

Praha, 2015

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze

a Akademie věd České republiky

Program:..... Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady:..... prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště:..... Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i.

Autor: Mgr. Pavel Mikulecký

Školitel: doc. Ing. Bohdan Schneider, CSc.

S dizertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

Souhrn	4
Úvod a cíle práce	5
Materiál a metodika	7
Výsledky a diskuze	8
Závěry	11

Contents

Summary	13
Introduction and aims of the thesis	14
Materials and methods	16
Results and discussion	17
Conclusions	20

Curriculum Vitae	22
------------------------	----

List of publications	23
----------------------------	----

Použitá literatura / References	24
---------------------------------------	----

Souhrn

Téměř ve všech dějích živých buněk hraje interakce mezi proteiny důležitou roli a funkce mnohých proteinů je závislá na jejich specifické interakci s ostatními biomolekulami. Pro vývoj molekul vhodných pro diagnostiku, medicínu a biotechnologie by bylo velmi přínosné, kdybychom měli k dispozici nástroje k ovlivňování interakcí mezi proteiny. Tato práce se zabývala specifitou interakcí mezi proteiny na modelovém příkladu receptoru 1 pro interferon gama (IFNgR1) a jeho přirozeném vazebném ligandu interferonu gama (IFNg), jehož funkce je důležitá pro přirozenou imunitu.

Při hledání mutací proteinu IFNgR1, které by měly měnit jeho vazbu (zvýšit nebo snížit) k IFNg, byla použita počítačová *in silico* analýza dostupných krystalových struktur komplexu mezi IFNgR1 a IFNg. Záměny aminokyselin byly počítačově modelovány a jejich vliv na interakci byl počítán programem FoldX. Všechny varianty receptoru 1, které vyhovovaly kritériím výběru, byly produkovány v bakterii *Escherichia coli*, dále purifikovány, charakterizovány a jejich interakce byla změřena na přístroji SPR, jenž měří povrchovou rezonanci plazmonů (Surface Plasmon Resonance).

První skupina variant IFNgR1 obsahovala mutace na interakčním rozhraní s IFNg. Z SPR měření vyplývá, že většina těchto variant vykazovala stejnou vazbu k IFNg jako nezměněný „wild-type“ receptor, několik variant mělo vazbu lehce zvýšenou, nicméně další varianty měly vazbu silnější. Druhá skupina variant obsahovala mutace, které se nacházely buď přímo, nebo v blízkém okolí kavit uvnitř molekuly IFNgR1. Tento přístup je méně obvyklý. Ačkoliv výsledky ukazovaly, že tyto mutace samy o sobě ovlivňují vazbu mezi receptorem a IFNg velmi málo, dvě varianty kombinující mutaci na rozhraní s mutací v kavitě měly výrazně zvýšenou vazbu.

Naše výsledky ukázaly, že lze získat varianty IFNgR1 s vyšší vazbou k IFNg pomocí kombinace experimentálních přístupů spolu s počítačovými návrhy, které využívají poměrně jednoduché a přístupné protokoly. Vývoj nových molekul s vysokou afinitou pomáhá k lepšímu pochopení sil, které se uplatňují při interakcích mezi proteiny. Tyto nově vyvinuté mutanty přirozených proteinů by se rovněž mohly stát základem pro nové diagnostické nástroje.

Úvod a cíle práce

Proteiny s uměle pozměněnými vazebnými vlastnostmi k jiným molekulám se staly důležitým nástrojem ve výzkumu, biotechnologii a biomedicině. Při návrhu proteinů s požadovanými změnami jsou stále častěji využívány počítačové metody a algoritmy (Karanicolas and Kuhlman, 2009; Kortemme and Baker, 2004; Kraemer-Pecore *et al.*, 2001; Mandell and Kortemme, 2009; Reichmann *et al.*, 2007), ačkoliv tyto metody stále ještě čelí problémům, které jsou spojené s přesností a důvěryhodností počítačových předpovědí. Tyto nepřesnosti vycházejí především ze stále ještě nedostatečného pochopení složitých strukturních a energetických složek, které se uplatňují při interakcích mezi proteiny. Tato práce představuje výsledky studií, které experimentálně potvrzují návrhy modifikací provedené pokročilými, avšak snadno dostupnými, výpočetními technikami, jenž jsou založené na práci s krystalovými strukturami. Jako modelový systém byla vybrána interakce mezi interferonem gama (IFNg) a jeho přirozeným receptorem 1 (IFNgR1). Hlavním cílem bylo na základě výpočtů metodami molekulárního modelování zvýšit sílu (afinitu) vazby IFNgR1 k IFNg. Výsledky pomohou lepšímu pochopení principů, které se uplatňují při specifickém rozpoznávání a vazbě mezi důležitými proteiny z lékařského pohledu.

Interferon gama je cytokin, jenž hraje roli při vrozené i získané imunitě, a dále udržuje imunitní rovnováhu v těle (Lin and Young, 2013). Signalizace IFNg začíná jeho vazbou na receptor 1 (IFNgR1) a receptor 2 (IFNgR2), které se nacházejí na buněčném povrchu. Vytvoření tohoto tzv. ternárního komplexu následně spouští signalizační dráhu nazývanou JAK/STAT, jež postupně vede k výsledné imunitní reakci. Například při diagnostice tuberkulózy se často využívá právě detekce interferonu gama, která je základem komerčních souprav s názvem QuantiFERON-TB Gold nebo T-SPOT.TB. Novější techniky pro detekci cytokinů, včetně IFNg, zahrnují biosenzory (Battaglia *et al.*, 2005; Chou *et al.*, 2010; Stigter *et al.*, 2005; Stybayeva *et al.*, 2010), které využívají různé typy rozpoznávacích molekul, jakými mohou být například pozměněné ligandy nebo nově vyvinuté molekuly, zejména protilátky či jejich části.

Cílem této práce bylo vytvořit proteinové molekuly s vysokou vazbou k interferonu gama, jejichž základem bude receptor 1 pro IFNg. Projekt začínal návrhem variant receptoru 1 se zvýšenou afinitou pomocí výpočetní techniky založené na analýze krystalových struktur a následném molekulárním modelování. Počítačově navržené varianty IFNgR1 byly pak

produkovány jako rekombinantní proteiny, purifikovány a jejich vlastnosti zjišťovány biofyzikálními metodami.

Změna vazebných vlastností IFNgR1 vůči IFNg byla založena na dvou komplementárních výpočetních přístupech. Při první strategii byly hledány aminokyseliny vhodné k mutování na interakčním rozhraní mezi receptorem a IFNg. Při druhé strategii byly vhodné aminokyselinové záměny hledány tzv. kavity uvnitř molekuly receptoru a následně aminokyseliny, jež byly v blízkém sepetí s těmito kavitami. Výpočetní analýza odhalila několik aminokyselin vhodných k mutování a jejich afinity k IFNg byly změřeny metodou SPR, která měří povrchovou rezonanci plazmonů. Vypočítané a změřené afinity byly mezi sebou porovnány a celkový proces návrhu a testování receptorových variant byl shrnut do protokolu popisujícího výpočetní postupy, které vedou k předpovězení mutací zvyšující rozpoznání mezi IFNg a jeho receptorem 1.

Cíle práce

A) Počítačové modelování aminokyselinových záměn vedoucích ke zvýšení afinity IFNgR1 k IFNg

Tato část práce zahrnovala analýzu krystalových struktur komplexu mezi IFNg a IFNgR1, identifikaci kavit uvnitř IFNgR1, výpočetní návrh receptorových variant a analýzu sekvenční konzervovanosti aminokyselin receptoru. Snahou bylo vytvořit protokol, kterým by bylo možné navrhnout mutace, jenž ovlivňují afinitu mezi IFNgR1 a jeho ligandem IFNg.

B) Experimentální potvrzení navržených mutací

Tato část práce se zabývala hledáním podmínek pro produkci a purifikaci IFNg, IFNgR1 a jeho variant. Dále byly charakterizovány sekundární struktury a teplotní stability navržených receptorových variant, naměřeny afinity všech produkovaných variant a analyzovány jejich vazebné vlastnosti k IFNg.

C) Porovnání vypočítaných a naměřených afinit

Tato část práce se skládala z analýzy vnitřní dynamiky receptorových variant a diskuze vypočtených a naměřených afinit.

Materiál a metodika

Detailní výčet použitého materiálu, chemikálií a přístrojů se nachází v plné verzi dizertační práce. Z nejdůležitějších metod lze uvést:

Výpočetní část

- Modelování chybějících aminokyselin v krystalových strukturách.
- Analýza interakčního rozhraní mezi proteiny v krystalových strukturách a návrh příslušných variant.
- Identifikace vnitřních kavit a návrh příslušných variant.
- Výpočet hodnot změny volné energie ($\Delta\Delta G$) pomocí programu FoldX.
- Analýza sekvenční konzervovanosti aminokyselin.

Experimentální část

- Práce s DNA, např. polymerázová řetězová reakce (PCR), vytvoření vektorů a místně-specifická mutageneze.
- Práce s buňkami, např. příprava a transformace/transfekce různých typů buněk a kultivace buněk.
- Purifikace proteinů, např. na NiNTA nebo SP kolonkách, „refolding“, gelová chromatografie.
- Měření teplotních stabilit pomocí metody nazývané „Thermal Shift Assay“ a spekter cirkulárního dichroismu.
- Zjištění afinit na přístroji, který měří povrchovou rezonanci plazmonů (SPR).

Výsledky a diskuze

Za účelem předpovídání mutací, které ovlivní interakci mezi proteiny požadovaným směrem, byly využity výpočetní metody a tyto mutace byly následně charakterizovány biofyzikálními technikami. Výpočetní metody jsou poměrně rychlé a málo nákladné, čímž se stávají velmi zajímavou strategií při zkoumání mutací ovlivňující vazbu mezi proteiny. V této práci byla vyvinuta nová výpočetní strategie hledání mutací v extracelulární části receptoru 1 pro interferon gama (IFNGR1), které mají za cíl zvýšit jeho vazbu k interferonu gama (IFNg). Afinita (síla vazby) navržených receptorových variant byla zjištěna metodou, která měří povrchovou rezonanci plazmonů (SPR), a dále byly popsány jejich vazebné vlastnosti.

Výchozím bodem bylo hledání mutovatelných aminokyselin na rozhraní mezi proteiny IFNg a IFNGR1, jenž spolu tvoří komplex. Analýza byla založena na dvou krystalových strukturách komplexu mezi IFNg a IFNGR1, konkrétně se jedná o struktury v PDB databázi označené 1FG9 (Thiel *et al.*, 2000) a 1FYH (Randal and Kossiakoff, 2001). Pro další postup byly hledány pouze ty aminokyseliny na receptoru, které byly vzdáleny maximálně 6 Å od IFNg, a to proto, aby nebyly vynechány žádné možné kontakty mezi těmito dvěma proteiny. Tímto výpočtem byl získán soubor 40 aminokyselin vhodných pro mutaci a každá aminokyselina byla zaměněna za zbylých 19. Následně byla programem FoldX (Schymkowitz *et al.*, 2005) dopočítána změna volné energie ($\Delta\Delta G$) pro každou záměnu a bylo zjištěno, že změny jsou poměrně malé. To znamená, že předpovězené jedno-aminokyselinové záměny nemusí mít ve skutečnosti výrazný vliv na afinitu. Vysvětlením tohoto výsledku by mohlo být, že afinita rozpustného receptoru k IFNg je v již nanomolárním rozmezí (Landar *et al.*, 2000; Marsters *et al.*, 1995; Walter *et al.*, 1995) a další zvýšení afinity je proto obtížný úkol.

Mutování aminokyselin, které se nacházejí na rozhraní mezi proteiny a jsou tak v přímém kontaktu, se jeví jako přirozená strategie, nicméně tato práce se dále zabývala i alternativním přístupem. Tato alternativní strategie se zaměřila na kavity uvnitř jednoho z vazebných partnerů a záměny v těchto oblastech, které by mohly vést ke zvýšení vazby (Atwell *et al.*, 1997; Kawasaki *et al.*, 2010; Morellato-Castillo *et al.*, 2013). Kavity byly hledány v molekule IFNGR1 a aminokyseliny, které se nacházejí v blízkém okolí těchto kavit, byly dále analyzovány programem FoldX. Podobně jako v předchozím případě u mutací na rozhraní mezi proteiny, byla vypočítána změna volné energie ($\Delta\Delta G$) vazby způsobené záměnou aminokyselin. Výpočty vedly k výběru 12 konkrétních aminokyselinových záměn, které byly

dále analyzovány metodou nazývanou „molecular dynamics relaxation“. Výsledkem byly 4 varianty, s kterými bylo dále experimentálně pracováno. Výpočetní výsledky opět ukazovaly pouze malý potenciál mutací, přičemž možnou příčinou mohou být malé objemy kavit a také skutečnost, že aminokyseliny poblíž kavit mají vysokou sekvenční konzervovanost.

Celkově bylo navrženo několik devět jedno-aminokyselinových záměn na rozhraní mezi proteiny, dále osm vícečetných mutací, kam se řadí také kombinace nejlepší jednobodové mutace N96W na rozhraní s mutacemi v kavitách. Všechny receptorové varianty byly produkovány v bakterii *Escherichia coli* podle protokolu, který byl vyvinut pro nezměněný „wild-type“ receptor po vyzkoušení několika expresních systémů a různých kombinací jeho produkce a purifikace. Každý pokus narážel na stále stejný problém, přítomnost rozpustné oligomerní formy receptoru a absenci nebo extrémně malé koncentrace monomerní formy. Po otestování velkého množství různých refoldovacích strategií jsme se rozhodli používat protokol, jenž byl relativně málo pracný a který poskytoval množství proteinu dostatečné pro charakterizace a měření vazby SPR metodou.

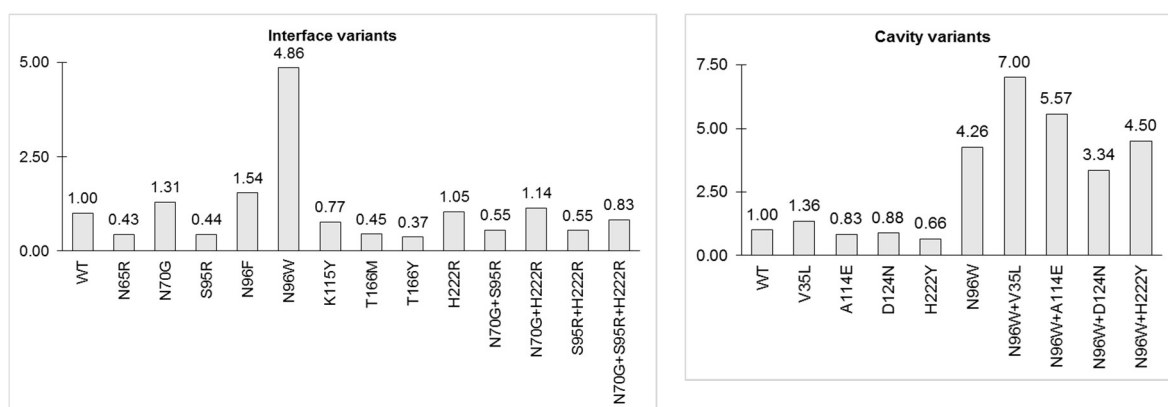
Významný úspěch způsobu předpovědi mutací výpočetní technikou lze spatřovat v tom, že veškeré předpovězené receptorové varianty mají afinitu k IFN γ v nanomolárním rozmezí. Nové varianty lze rozdělit do tří skupin podle toho, jakou mají afinitu vzhledem k nezměněnému „wild-type“ receptoru (WT) (Obrázek 1). Do první skupiny se řadí varianty s afinitou dva až třikrát vyšší než WT, například varianty N65R, S95R nebo T166Y nacházející se na interakčním rozhraní mezi proteiny. Většina variant spadá do druhé skupiny mutací, které nemají skoro žádný vliv na vazbu, sem patří například varianty N70G nebo N96F a dále mutace poblíž kavit. Třetí skupina zahrnuje varianty s významně vyšší afinitou v porovnání s WT receptorem. Nejvyšší, pětinasobné zvýšení afinity, bylo pozorováno u varianty N96W, pozice 96 se nalézá na rozhraní mezi proteiny. Kombinace této mutace s mutací V35L nacházející se v kavitě vedla až k sedminásobnému navýšení afinity. Ukázali jsme tak, že ačkoliv mutace poblíž kavit nejsou v přímém kontaktu s ligandem, celkově mohou zvýšit afinitu v kombinaci s mutacemi na interakčním rozhraní.

Měření spekter cirkulárního dichroismu sloužilo k ověření sekundární struktury WT receptoru a jeho vybraných variant (V35L, N96W a N96W+V35L). Naměřená spektra vykazovala velmi vysokou podobnost u všech měřených proteinů, a tudíž lze říci, že mutace nezpůsobily velké změny v celkové struktuře (foldu) proteinů.

Metoda SPR má jedinečnou vlastnost měřit kinetické vlastnosti vazby v reálném čase. Bylo zjištěno, že většina receptorových variant vykazovala rychlou asociaci (k_{on}) s IFNg, která ale byla následována rovněž rychlou disociací (k_{off}). Avšak u variant N96W a N96W+V35L byla pozorována pomalejší disociace, což je příčina vyšší afinity, která se vyjadřuje disociační konstantou (K_d) podle vztahu $K_d = k_{off}/k_{on}$, kdy nižší hodnota K_d znamená vyšší afinitu. Tyto jiné kinetické vlastnosti odlišují dvě varianty s nejvyšší afinitou od ostatních (Obrázek 2).

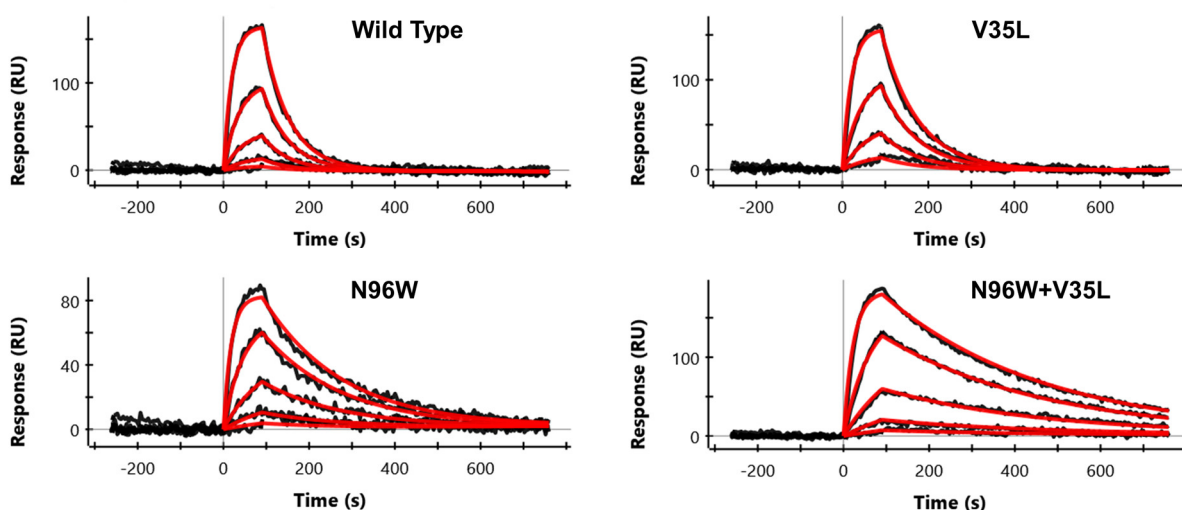
Obrázek 1

Porovnání vazby receptorových variant vzhledem k nezměněnému „wild-type“ receptoru. Afinity byly naměřeny SPR metodou. Grafy představují afinity variant s mutacemi nacházejícími se na rozhraní mezi dvěma proteiny (vlevo) a mutacemi poblíž kavit (vpravo).



Obrázek 2

SPR sensorgramy ukazující interakci mezi IFNg-SC a vybranými variantami receptoru. Varianta V35L se chová podobně jako WT, tudíž lze pozorovat rychlou asociaci (k_{on}) i disociaci (k_{off}). Dvě varianty (N96W a N96W+V35L) vykazují pomalejší disociaci v porovnání s WT receptorem, a tudíž jejich afinita (K_d) je vyšší.



Výsledky tak ukázaly, že výpočetní technikou je možno navrhnout mutace v rámci molekuly receptoru, jak na rozhraní s IFNg, tak poblíž kavit. Tento přístup lze proto využít k dalšímu zvýšení vazby mezi dvěma proteiny, i když jejich interakce je již evolučně optimalizovaná s afinitou v nanomolárním rozmezí.

Závěry

Cílem této práce bylo najít aminokyselinové záměny v receptoru 1 pro interferon gama (IFNgR1), které změní afinitu IFNgR1 k jeho přirozenému ligandu interferonu gama (IFNg). Důležitým rysem práce byla kombinace výpočetní techniky s experimentálními metodami.

A) Počítačové modelování aminokyselinových záměn vedoucích ke zvýšení afinity IFNgR1 k IFNg

Pro nalezení mutací, které ovlivňují vazbu mezi modelovými proteiny IFNgR1 a IFNg, byl vyvinut nový protokol založený na počítačové analýze krystalových struktur 1FG9 (Thiel *et al.*, 2000) and 1FYH (Randal and Kossiakoff, 2001), sekvenční konzervovanosti a výpočtech volné energie programem FoldX (Schymkowitz *et al.*, 2005). Protokol byl využit při návrhu několika jedno-, dvoj-, i troj-aminokyselinových záměn v molekule receptoru. Byly kombinovány mutace na interakčním rozhraní mezi IFNgR1 a IFNg1 a v kavitách IFNgR1.

B) Experimentální potvrzení navržených mutací

Pro účely této práce byl vytvořen nový protokol pro produkci a purifikaci jak IFNg, tak „wild-type“ IFNgR1 a jeho variant. Bylo otestováno mnoho různých protokolů pro produkci IFNgR1 v různých expresních systémech, například v hmyzích S2 buňkách, kvasinkových *Pichia pastoris* buňkách a bakterii *Escherichia coli*. Všechny vybrané receptorové varianty byly úspěšně produkovány v *E. coli*, refoldovány, purifikovány a jejich vazebné vlastnosti zjištěny pomocí metody, která měří povrchovou rezonanci plazmonů (SPR). Nejlepší varianta nacházející se na rozhraní mezi IFNgR1 a IFNg měla afinitu pětikrát vyšší než WT receptor. Tato afinita byla dále zvýšena na sedminásobek oproti WT mutací V35L nacházející se v kavitě uvnitř receptoru, ačkoliv tato mutace sama o sobě měla podobné vazebné vlastnosti jako WT receptor.

Dále byly naměřeny teplotní stability navržených receptorových variant a jejich sekundární struktury byly určeny na základě spekter cirkulárního dichroismu, aby bylo vyloučeno, že zvýšení afinity není způsobeno změnou ve struktuře proteinů. SPR měření ukázala, že zvýšení vazby bylo způsobeno především pomalejší disociací volného IFNg od receptoru, jenž byl navázán na povrchu SPR čipu.

C) Porovnání vypočítaných a naměřených afinit

Počítačově předpovězené změny afinit interakcí variant IFN γ R1 s IFN γ byly porovnány s experimentálními hodnotami. Vyhodnocení výpočtů molekulární dynamikou naznačuje, že pomalejší disociace N96W varianty, a tedy její vyšší afinita, je způsobena entropickou stabilizací nově zavedeného tryptofanu v komplexu relativně k volnému IFN γ R1. Tryptofan je ve volném proteinu jako částečně hydrofobní residuum destabilizován a tím snižuje entropickou penalizaci tvorby komplexu. Ačkoliv varianty receptoru, které se nacházejí poblíž kavit, mají podobnou afinitu jako WT receptor, mohou zvyšovat vazbu mutací, jenž se nacházejí na rozhraní mezi IFN γ a IFN γ R1. Vysvětlením tohoto efektu by mohlo být omezení pohybu molekuly, což může souviset s entropickými změnami po vytvoření komplexu (Marlow *et al.*, 2010; Wand, 2013). Nicméně lepší pochopení vlivu mutací na vazbu mezi IFN γ R1 a IFN γ by vyžadovalo důkladnější termodynamickou charakterizaci a stanovení krystalových struktur variant ve volném stavu i v komplexu.

Shrnutí

Tato práce se zabývala úkolem výpočetní metodou navrhnout mutace v proteinu tak, aby tyto mutace dále zvýšily afinitu vazby k přirozenému vazebnému partneru proteinu z nanomolárních hodnot. Výsledky ukazují, že takové výpočetní návrhy podpořené experimentálními daty jsou použitelným přístupem pro ovlivnění vazby, který může dále pomoci k lepšímu pochopení strukturních a energetických složek uplatňujících se při interakcích mezi proteiny.

Summary

Protein-protein interactions play an important role in nearly all processes of the living cells and the function of many proteins is dependent on their specific interactions with other biomolecules. A reliable tool to modulate these interactions would be invaluable for the development of molecules suitable for diagnostics, medicine, and biotechnology. In this work, we aimed to study the specificity of interactions in the model system of Interferon gamma receptor 1 (IFNgR1) and its natural ligand Interferon gamma (IFNg), protein important in innate immunity.

We searched for mutations within the interferon receptor molecule IFNgR1 to modulate (increase as well as decrease) its affinity to IFNg by *in silico* analysis of the existing crystal structures of the complex between IFNgR1 and IFNg. We modeled amino acid substitutions and gauged how they influenced the interaction using empirical force field implemented in software FoldX. All selected promising IFNgR1 variants were expressed in *Escherichia coli*, purified to homogeneity, characterized, and kinetics of their interactions with IFNg was measured by Surface Plasmon Resonance (SPR).

The first set of IFNgR1 variants included mutations on the interface of the IFNg/IFNgR1 complex. According to our SPR measurements, the affinity of most of these receptor variants had virtually the same affinity as the wild-type receptor, a few had affinity slightly decreased, but a few variants bound IFNg with significantly higher affinity. The second, less orthodox approach comprised single mutations within the cavities of the IFNgR1 molecule. The results of these calculations suggested that they influenced the receptor affinity to IFNg very little. However, two cavity mutations increased the IFNgR1 affinity significantly in combination with the interface mutations.

Our results demonstrated that the combination of a computer-aided design using a relatively simple and accessible computational protocol together with experimental approaches was capable of predicting IFNgR1 variants with significantly increased affinity to IFNg. These new high-affinity binders help in better understanding of forces governing protein-protein interactions and could be developed into a new diagnostic tool.

Introduction and aims of the thesis

Proteins with artificially and specifically modified binding affinities to other molecules have become a helpful tool in research, biotechnology, and biomedicine. Computer-aided “rational design” of proteins with specifically targeted modifications is becoming a standard tool of protein engineering (Karanicolas and Kuhlman, 2009; Kortemme and Baker, 2004; Kraemer-Pecore *et al.*, 2001; Mandell and Kortemme, 2009; Reichmann *et al.*, 2007), although we still face some limitations in precision and reliability of computer predictions, which arise from our still incomplete comprehension of the structural and energetic aspects of protein-protein interactions. In this work, we aimed at testing power of combining an advanced structure-based yet affordable computer techniques with experimental confirmation of the computationally designed modifications. As a model system, we chose to study the interactions between Interferon gamma receptor 1 (IFN γ R1) and its natural ligand, Interferon gamma (IFN γ). The main goal of the project was to enhance the affinity of IFN γ R1 to IFN γ , as this approach could help to better understand the principles that govern the specificity and affinity of biomolecular recognition between these medically important proteins.

Interferon gamma is a cytokine of innate and adaptive immune responses but it also maintains immune homeostasis (Lin and Young, 2013). The IFN γ signaling pathway begins with its binding to the cellular receptor 1 and further to receptor 2 (IFN γ R2). The formation of the ternary complex subsequently activates the JAK/STAT signaling pathway leading to the establishment of immune response. The detection of IFN γ has been used for the diagnosis of tuberculosis, for example in commercial kits such as QuantiFERON-TB Gold or T-SPOT.TB. Newer techniques in cytokine detection, including IFN γ detection, comprise biosensors (Battaglia *et al.*, 2005; Chou *et al.*, 2010; Stigter *et al.*, 2005; Stybayeva *et al.*, 2010) utilizing different types of recognition elements – either engineered natural binding partners or *ad hoc* developed constructs such as antibodies or their components.

The goal of this work was development of high affinity IFN γ binders based on IFN γ natural binding partner, IFN γ R1. This task was tackled by computer-aided design of IFN γ variants with increased affinity using protocol based on analysis of crystal structures, molecular modeling, and subsequent validation of the predictions by biophysical measurements of expressed and purified model proteins. The modulation of the binding affinity of receptor 1 to IFN γ was based on two complementary structure-based strategies. In the first one, we searched

for mutable residues at the IFN γ R1 interface with IFN γ , in the second strategy we searched for cavities inside the receptor structure and for amino acid replacements filling these cavities. Our computer analysis revealed several residues amenable to mutations, and all the designed variants were expressed, purified, and their affinities to IFN γ were experimentally determined by Surface Plasmon Resonance (SPR). The predicted and measured affinities were compared and discussed, and the resulting process of design and testing of the receptor variants was formalized into an accessible protocol describing how to predict mutations increasing recognition between IFN γ and its receptor 1.

The aims of the thesis

A) Computer modeling to increase the IFN γ R1 affinity to IFN γ

This part included the analysis of the crystal structures of the IFN γ /IFN γ R1 complex, identification of cavities within the IFN γ R1 molecule, *in silico* design of the interface and cavity variants, and determination of sequence conservancy of IFN γ R1 residues. We worked towards developing a protocol that would enable to find mutations modulating the affinity between IFN γ R1 and IFN γ .

B) Experimental affirmation of the computer predictions

This part focused on the establishment and optimization of protocols for expression and purification of IFN γ , IFN γ R1 and its variants. We characterized the secondary structure and temperature stability of IFN γ R1 variants and experimentally determined affinities of the designed IFN γ R1 variants and analyzed the kinetics of binding to IFN γ .

C) Comparison of predicted and measured affinities

This part comprised the analysis of internal dynamics of the IFN γ R1 variants and we discussed computer-predicted and experimental affinities.

Materials and methods

The full list of used materials and equipment is included in the PhD thesis. The main methods employed to fulfill aims stated in the previous chapter are following:

Computational work

- Modeling of missing residues.
- Analysis of interfaces in crystal structures and design of interface variants.
- Identification of internal cavities and design of cavity variants.
- FoldX calculations of $\Delta\Delta G$ values.
- Analysis of sequence conservancy.

Experimental work

- Work with DNA, e.g. Polymerase Chain Reaction, construction of various vectors, and site-directed mutagenesis.
- Work with cells, e.g. preparation and transformation/transfection of various types of cells, and cell cultivation.
- Purification of proteins, e.g. on NiNTA agarose or SP sepharose, refolding, size exclusion chromatography.
- Measurement of melting temperatures by Thermal Shift Assay and Circular Dichroism spectrometry.
- Measurement of affinities by Surface Plasmon Resonance (SPR).

Results and discussion

We employed computational methods to predict the mutations that would influence affinity of proteins in the preferred way, and biophysical techniques to confront these predictions with experimental measurements. The application of computational methods for the evaluating of the effect of mutation on protein-protein interactions is an attractive strategy, because the predictions are relatively fast and cost-effective. Here, we developed a new computational strategy to find mutations within the extracellular part of Interferon gamma receptor 1 (IFN γ R1) leading to increase of affinity to its native ligand Interferon gamma (IFN γ). We measured affinities of selected IFN γ R1 variants by Surface Plasmon Resonance (SPR) and analyzed their kinetic properties.

We started with optimizing residues on the interface between the protein components of the IFN γ /IFN γ R1 complex. Our initial analysis was based on two crystal structures of IFN γ /IFN γ R1 complex with PDB codes 1FG9 (Thiel *et al.*, 2000) and 1FYH (Randal and Kossiakoff, 2001). We decided to identify amino acids on IFN γ R1 molecule that are closer to the IFN γ than 6.0 Å, not to miss any possible contact between these two proteins. We got a set of 40 residues that seemed to be suitable for mutation, and we replaced each of the 40 selected receptor residues by the remaining 19 natural amino acids and calculated change of free energy ($\Delta\Delta G$) using FoldX software (Schymkowitz *et al.*, 2005). The calculated energy changes ($\Delta\Delta G$) were relatively small, meaning that the predicted single point mutation may not cause dramatic affinity increase in real samples. This result can be explained by the fact that the affinity of the soluble receptor to the IFN γ is already in nanomolar range (Landar *et al.*, 2000; Marsters *et al.*, 1995; Walter *et al.*, 1995) and further improvement is apparently a challenging task.

Mutating the interface residues directly interacting with ligand is intuitively obvious strategy but we decided to test also an alternative approach. It attempts to increase affinity by filling cavities of one of the interacting partners (Atwell *et al.*, 1997; Kawasaki *et al.*, 2010; Morellato-Castillo *et al.*, 2013). We searched for internal cavities within the IFN γ R1 molecule and listed all residues forming cavities for *in silico* analysis by FoldX. We calculated the changes of free energy ($\Delta\Delta G$) of binding in a similar way to the case of interface variants, and we got twelve promising residues that were subjected to molecular dynamics relaxation analysis to suggest four variants for experimental work. Again, the calculations of $\Delta\Delta G$ show only modest

potential gains in interaction affinity, perhaps due to small cavity volumes and also due to the fact that they are often lined by highly conserved residues.

We designed several single-point interface IFNgR1 variants, together with multiple-site variants comprising also combination of best interface N96W mutation with cavity lining mutations. All receptor variants were expressed in *Escherichia coli* according to protocol that was established for wild-type receptor after testing several expression systems and numerous combinations of production and purification approaches in *E. coli*. Every time we faced the very same problem – oligomerization of a yet soluble receptor. After scanning of a large number of different refolding strategies we decided to use one protocol that was relatively easy and produced sufficient amount of monomeric receptor for protein characterization and SPR measurement, the crucial experiment.

A significant success of our computer predictions was that all selected IFNgR1 variants could bind IFNg-SC in nanomolar range. When we compared the measured affinity values of IFNgR1 variants to WT receptor (Figure 1), we classified variants into three groups. First category comprised variants with affinity about two or three times lower than WT, such as interface N65R, S95R, or T166Y variants. The majority of variants fell into a second group of mutations causing almost no change in affinity, for example interface variants N70G or N96F, and all cavity variants. Third class included variants with affinity higher than WT. A significant, about five-fold, increase of affinity compared to WT was observed for the interface N96W variant. Furthermore, the combination of interface N96W variant with cavity V35L mutation led to a significant seven-fold increase of affinity compared to WT receptor. Altogether, we suggest that mutations of cavity amino acids with no direct contact with the ligand can contribute to the overall increase of affinity in combination with interface mutations.

We investigated the secondary structure of WT receptor and its three designed variants, namely V35L, N96W, and N96W+V35L, by circular dichroism (CD) to confirm their structural integrity upon mutation. The measured CD spectra showed high similarity of all four proteins, therefore we could conclude that mutations did not cause any major global structural reorganization.

SPR method has unique feature to measure the kinetics of binding in real time. We discovered that most of the IFNgR1 variants exhibited quite similar fast association (k_{on}) to IFNg-SC followed also by fast dissociation (k_{off}). However, we observed slower release of IFNg-SC

from N96W and N96W+V35L variants which evinced significantly higher affinity that is expressed by dissociation constant (K_d) according to equation $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$, lower value of K_d represents higher affinity. These altered kinetic behavior distinguishes them from the other variants (Figure 2).

Figure 1

Affinities of the wild-type IFNgR1 (WT) and variants to IFNg-SC obtained from SPR measurements. Graphs represents relative affinities of IFNgR1 interface (left) and cavity (right) variants compared to WT.

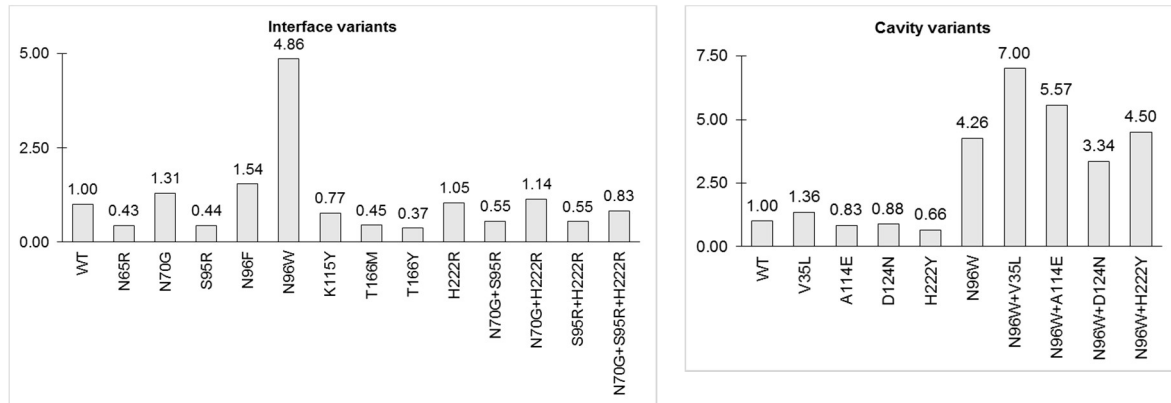
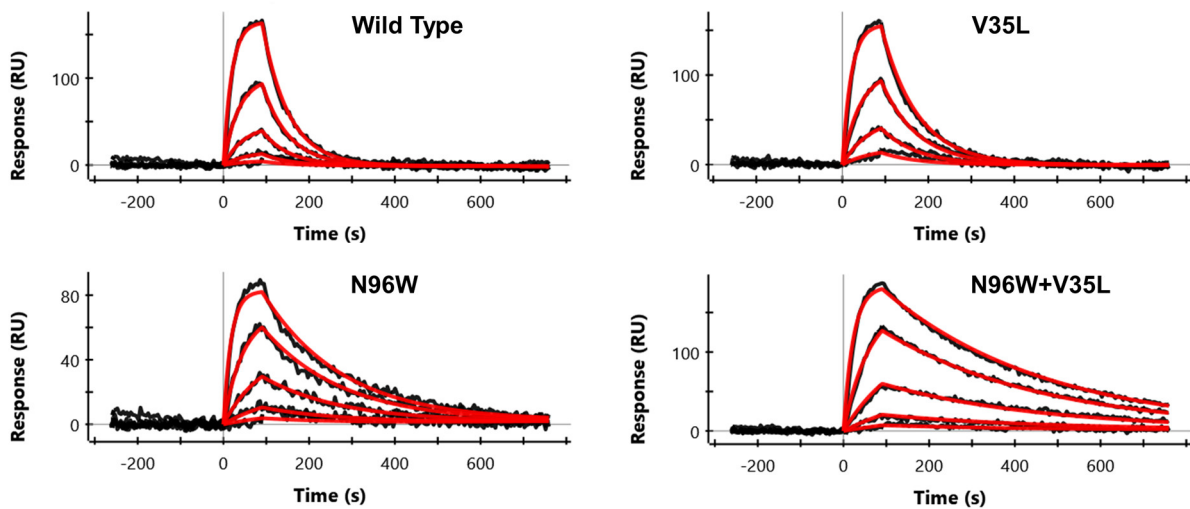


Figure 2

SPR sensorgrams showing the interaction between IFNg-SC and selected IFNgR1 variants. V35L variant behaves similarly as WT displaying fast association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) phases. Two variants (N96W and N96W+V35L) with higher affinities (K_d) compared to WT bind IFNg-SC with slower dissociation phase, thus increasing the affinity.



Our results demonstrated that computer-aided design of mutations within the receptor molecule, on the interface, in cavities or their combination, is a useful approach to increase the binding between two proteins with already evolutionary highly optimized interface and the affinity in the nanomolar range.

Conclusions

In this thesis, we combine the computational methods with experimental techniques to identify amino acids within extracellular domain of Interferon gamma receptor 1 (IFNgR1) suitable for modulation of affinity to its natural ligand Interferon gamma (IFNg).

A) Computer modeling to increase the IFNgR1 affinity to IFNg

In search for mutations modulating the affinity between our model proteins IFNgR1 and IFNg we developed a new protocol that is based on *in silico* analysis of crystal structures 1FG9 (Thiel *et al.*, 2000) and 1FYH (Randal and Kossiakoff, 2001), sequence conservancy, and free energy calculations by a FoldX empirical force field (Schymkowitz *et al.*, 2005). We applied our protocol to design several single-point IFNgR1 variants, together with multiple-site variants comprising also combination of interface mutations with cavity filling mutations.

B) Experimental affirmation of the computer predictions

We developed new protocols for the production and purification of Interferon gamma as well as wild-type Interferon gamma receptor 1 and its variants. We tested a large number of protocols to produce IFNgR1 in different expression systems such as insect S2 cells, yeast *Pichia pastoris* cells, and bacteria *Escherichia coli*. All selected IFNgR1 variants were successfully expressed in *E. coli*, refolded, purified to homogeneity, and their affinities to IFNg were measured by Surface Plasmon Resonance (SPR). The best interface variant N96W has affinity five-fold higher than wild-type (WT) receptor and this affinity is enhanced to seven-fold by the addition of a cavity mutation V35L, although the V35L variant itself has similar affinity to WT.

We measured the thermal stabilities of the best IFNg binders and confirmed by CD spectra that their affinity increases were not accompanied by major global structural rearrangements. It became apparent from the SPR results that the affinity increase was mainly caused by dissociation slowdown of free IFNg from IFNgR1 variants coated on the surface of the chip.

C) Comparison of the predicted and measured affinities

We compared computer predictions with the experimental results in an attempt to identify the structural source of the affinity increase. Interpretation of molecular dynamics (MD) simulations indicated that slower dissociation rate of the N96W interface variant and therefore its higher affinity is caused by an entropic stabilization of the introduced tryptophan residue in the complex with IFN γ relative to the free state. There are also signs of hydrophobic destabilization of the free receptor at position 96. Although the cavity IFN γ R1 variants have similar affinities to the WT receptor, they can enhance the binding of the interface variants by restricting molecular fluctuations, which can be related to reduced entropy penalty upon binding (Marlow *et al.*, 2010; Wand, 2013). However, we still need a more complete thermodynamic characterization of the IFN γ R1 variants and their complexes to better comprehend the impact of mutations on the affinity between IFN γ R1 and IFN γ .

Summary

In this study, we faced the challenging task of increasing the binding between two proteins with already high affinity in a nanomolar range by employing computational methods. Our results demonstrate that computational design of protein variants supported by their experimental measurements can be an applicable approach for affinity modulation and can help in further understanding of the forces governing the protein-protein interactions.

Curriculum Vitae

Pavel Mikulecký

Truhlarova 638/2, Prague, 19800, Czech Republic

mikulecky@outlook.com; +420 702 039 559

Education

- 2010 – Present **PhD candidate** at Charles University in Prague, Faculty of Science
Study program: Molecular and Cell Biology, Genetics and Virology
Thesis title: Increasing affinity of Interferon gamma receptor 1 to Interferon gamma by combining molecular modeling and experimental methods
Expected defense in October 2015
Supervisor: Dr. Bohdan Schneider
- 2008 – 2010 **Master of Science** at Charles University in Prague, Faculty of Science
Study program: Genetics, Molecular Biology and Virology
Thesis title: Construction and characterization of recombinant adenylate cyclase toxoid of bacterium *Bordetella pertussis* carrying mycobacterial antigen TB7.7
Supervisor: Dr. Ondrej Stanek
- 2005 – 2008 **Bachelor of Science** at Charles University in Prague, Faculty of Science
Study program: Molecular Biology and Biochemistry of Organisms
Thesis title: New diagnostic methods of latent tuberculosis using antigens ESAT-6 and CFP-10
Supervisor: Prof. Peter Sebo
- 2005 **The English Language Examination** (Basic level B2)
- 2004 – 2005 The Language School Klub Polabiny IV, s.r.o., Pardubice
- 2000 – 2004 Grammar School of J.K.Tyl in Hradec Králové

Research experience

- 2012 – Present Institute of Biotechnology CAS, Laboratory of Biomolecular Recognition
- 2010 – 2012 Institute of Biotechnology CAS, Laboratory of Ligand Engineering
- 2007 – 2010 Institute of Microbiology CAS, Laboratory of Molecular Biology of Bacterial Pathogens

List of publications

- Mikulecky, P., Cerny, J., Biedermannova, L., Petrokova, H., Kuchar, M., Vondrasek, J., Maly, P., Sebo, P., and Schneider, B. (2013). Increasing affinity of interferon-gamma receptor 1 to interferon-gamma by computer-aided design. *Biomed Res Int*, 2013, 752514. doi: 10.1155/2013/752514.
- Černý, J., Biedermannová, L., Mikulecký, P., Zahradník, J., Charnavets, T., Šebo, P., and Schneider, B. (2015). Redesigning Protein Cavities as a Strategy for Increasing Affinity in Protein-Protein Interaction: Interferon- γ Receptor 1 as a Model. *Biomed Res Int*, 2015, 1-12. doi: 10.1155/2015/716945.
- Ahmad, J.N., Li, J., Biedermannova, L., Kuchar, M., Sipova, H., Semeradtova, A., Cerny, J., Petrokova, H., Mikulecky, P., Polinek, J., Stanek, O., Vondrasek, J., Homola, J., Maly, J., Osicka, R., Sebo, P., and Maly, P. (2012). Novel high-affinity binders of human interferon gamma derived from albumin-binding domain of protein G. *Proteins*, 80(3), 774-789. doi: 10.1002/prot.23234.
- Šípová, H., Ševců, V., Kuchař, M., Ahmad, J.N., Mikulecký, P., Osička, R., Malý, P., and Homola, J. (2012). Surface plasmon resonance biosensor based on engineered proteins for direct detection of interferon-gamma in diluted blood plasma. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 174, 306-311. doi: 10.1016/j.snb.2012.08.024.

Použitá literatura / References

- Atwell, S., Ultsch, M., De Vos, A.M., and Wells, J.A. (1997). "Structural plasticity in a remodeled protein-protein interface." *Science* **278**(5340): 1125-1128.
- Battaglia, T.M., Masson, J.F., Sierks, M.R., Beaudoin, S.P., Rogers, J., Foster, K.N., Holloway, G.A., and Booksh, K.S. (2005). "Quantification of cytokines involved in wound healing using surface plasmon resonance." *Anal Chem* **77**(21): 7016-7023.
- Chou, T.H., Chuang, C.Y., and Wu, C.M. (2010). "Quantification of Interleukin-6 in cell culture medium using surface plasmon resonance biosensors." *Cytokine* **51**(1): 107-111.
- Karanicolas, J., and Kuhlman, B. (2009). "Computational design of affinity and specificity at protein-protein interfaces." *Curr Opin Struct Biol* **19**(4): 458-463.
- Kawasaki, Y., Chufan, E.E., Lafont, V., Hidaka, K., Kiso, Y., Mario Amzel, L., and Freire, E. (2010). "How much binding affinity can be gained by filling a cavity?" *Chem Biol Drug Des* **75**(2): 143-151.
- Kortemme, T., and Baker, D. (2004). "Computational design of protein-protein interactions." *Curr Opin Chem Biol* **8**(1): 91-97.
- Kraemer-Pecore, C.M., Wollacott, A.M., and Desjarlais, J.R. (2001). "Computational protein design." *Curr Opin Chem Biol* **5**(6): 690-695.
- Landar, A., Curry, B., Parker, M.H., DiGiacomo, R., Indelicato, S.R., Nagabhushan, T.L., Rizzi, G., and Walter, M.R. (2000). "Design, characterization, and structure of a biologically active single-chain mutant of human IFN-gamma." *J Mol Biol* **299**(1): 169-179.
- Lin, F.-C., and Young, H.A. (2013). "The talented interferon-gamma." *Advances in Bioscience and Biotechnology* **04**(07): 6-13.
- Mandell, D.J., and Kortemme, T. (2009). "Computer-aided design of functional protein interactions." *Nat Chem Biol* **5**(11): 797-807.
- Marlow, M.S., Dogan, J., Frederick, K.K., Valentine, K.G., and Wand, A.J. (2010). "The role of conformational entropy in molecular recognition by calmodulin." *Nat Chem Biol* **6**(5): 352-358.
- Marsters, S.A., Pennica, D., Bach, E., Schreiber, R.D., and Ashkenazi, A. (1995). "Interferon gamma signals via a high-affinity multisubunit receptor complex that contains two types of polypeptide chain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5401-5405.
- Morellato-Castillo, L., Acharya, P., Combes, O., Michiels, J., Descours, A., Ramos, O.H., Yang, Y., Vanham, G., Arien, K.K., Kwong, P.D., Martin, L., and Kessler, P. (2013). "Interfacial cavity filling to optimize CD4-mimetic miniprotein interactions with HIV-1 surface glycoprotein." *J Med Chem* **56**(12): 5033-5047.
- Randal, M., and Kossiakoff, A.A. (2001). "The structure and activity of a monomeric interferon-gamma:alpha-chain receptor signaling complex." *Structure* **9**(2): 155-163.
- Reichmann, D., Rahat, O., Cohen, M., Neuvirth, H., and Schreiber, G. (2007). "The molecular architecture of protein-protein binding sites." *Curr Opin Struct Biol* **17**(1): 67-76.
- Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F., and Serrano, L. (2005). "The FoldX web server: an online force field." *Nucleic Acids Res* **33**(Web Server issue): W382-388.
- Stigter, E.C., de Jong, G.J., and van Bennekom, W.P. (2005). "An improved coating for the isolation and quantitation of interferon-gamma in spiked plasma using surface plasmon resonance (SPR)." *Biosens Bioelectron* **21**(3): 474-482.

- Stybayeva, G., Kairova, M., Ramanculov, E., Simonian, A.L., and Revzin, A. (2010). "Detecting interferon-gamma release from human CD4 T-cells using surface plasmon resonance." *Colloids Surf B Biointerfaces* **80**(2): 251-255.
- Thiel, D.J., le Du, M.H., Walter, R.L., D'Arcy, A., Chene, C., Fountoulakis, M., Garotta, G., Winkler, F.K., and Ealick, S.E. (2000). "Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon-gamma receptor complex." *Structure* **8**(9): 927-936.
- Walter, M.R., Windsor, W.T., Nagabhushan, T.L., Lundell, D.J., Lunn, C.A., Zauodny, P.J., and Narula, S.K. (1995). "Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor." *Nature* **376**(6537): 230-235.
- Wand, A.J. (2013). "The dark energy of proteins comes to light: conformational entropy and its role in protein function revealed by NMR relaxation." *Curr Opin Struct Biol* **23**(1): 75-81.